

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-170

(P2001-170A)

(43)公開日 平成13年1月9日(2001.1.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコト [*] (参考)
C 12 M	1/34	C 12 M	1/34
	1/30		B
G 01 N	1/04	G 01 N	1/04
	1/10		H
	21/78		N
		21/78	C

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-117611(P2000-117611)

(22)出願日 平成12年4月19日(2000.4.19)

(31)優先権主張番号 特願平11-115077

(32)優先日 平成11年4月22日(1999.4.22)

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田250番地

(72)発明者 原田 靖広

千葉県野田市野田250番地 キッコーマン

株式会社内

(72)発明者 村上 成治

千葉県野田市野田250番地 キッコーマン

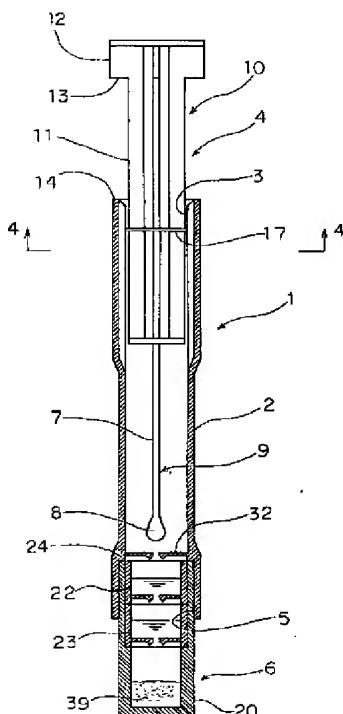
株式会社内

(54)【発明の名称】 検体検査用器具及び拭取検査用器具

(57)【要約】

【課題】高精度でATPを測定する器具を提供すること。

【解決手段】管状をし上下が開口された本体2、該本体2の上端開口部3に着脱自在に装通された保持部材10と該部材10に保持された綿棒9より成る検体拭取具4、及び試験管状をし発光試薬39が収納された測定容器20と管状をし上下の開口部にシール材が貼着されその内部に遊離ATP消去剤が封入されて成るATP消去剤容器22と管状をし上下の開口部にシール材が貼着されその内部に抽出剤が封入されて成る抽出剤容器23より成り測定容器20の上部開口部に上方に遊離ATP抽出剤容器22下方に抽出剤容器23を位置させてそれぞれを嵌装させて成る検体検査用器具6で拭取検査用器具1を構成し、検体検査用器具6を本体の下端開口部に嵌装させた。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】遊離ATP消去剤、抽出剤、及び発光試薬を組み込んだ検体検査用器具あるいは拭取検査用器具。

【請求項2】試験管状をし発光試薬が収納された測定容器、管状をし上下の開口部にシール材が貼着されその内部に遊離ATP消去剤が封入されているATP消去剤容器、及び管状をし上下の開口部にシール材が貼着されその内部に抽出剤が封入されて成る抽出剤容器より構成され、測定容器の上部開口部に上方に遊離ATP抽出剤容器、下方に抽出剤容器を位置させてそれを嵌装させて成ることを特徴とする請求項1記載の検体検査用器具。

【請求項3】遊離ATP消去剤容器及び抽出剤容器の内部下方部にシール材を破るためにブレーカが設置されていることを特徴とする請求項1又は2記載の検体検査用器具。

【請求項4】測定容器の上端部に遊離ATP消去剤容器の上方に位置するシール材を破るためにブレーカが設置されていることを特徴とする請求項1又は2記載の検体検査用器具。

【請求項5】管状をし上下が開口された本体、該本体の上端開口部に着脱自在に装通された保持部材と該部材に保持された綿棒より成る検体拭取具、及び試験管状をし発光試薬が収納された測定容器と管状をし上下の開口部にシール材が貼着されその内部に遊離ATP消去剤が封入されて成るATP消去剤容器と管状をし上下の開口部にシール材が貼着されその内部に抽出剤が封入されて成る抽出剤容器より成り測定容器の上部開口部に上方に遊離ATP抽出剤容器下方に抽出剤容器を位置させてそれを嵌装させて成る検体検査用器具より構成され、検体検査用器具を本体の下端開口部に嵌装させたことを特徴とする請求項1記載の拭取検査用器具。

【請求項6】本体内部の下方部に遊離ATP消去剤容器の上方のシール材を破るためにブレーカが設置されていることを特徴とする請求項1又は5記載の拭取検査用器具。

【請求項7】ATP消去剤容器及び抽出剤容器の内部下方にシール材を破るためにブレーカが設置されていることを特徴とする請求項1又は5記載の拭取検査用器具。

【請求項8】下方にブレーカ破り部材が設置され管状をし上下が開口された本体、該本体の上部開口部に着脱自在に挿通された保持部材と該部材に保持された綿棒より成る検体拭取具、本体の下方に設置された遊離ATP抽出剤容器と抽出剤容器、及び試験管状をし本体下端部の開口部に上下動自在に挿通されて成る測定容器より構成されることを特徴とする請求項1又は5記載の拭取検査用器具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は、液体中あるいは

2

固体表面の生物細胞を採取し遊離ATPを消去した後、発光反応によりその量を測定する器具に関する。

【0002】

【従来の技術】大腸菌、酵母菌、乳酸菌及びその他の生物細胞の測定は、食品衛生、バイオ、臨床検査、医学、超純水、環境などの分野において非常に重要である。一般に生物細胞の測定は、血球計算盤による顕微鏡下での計測法（顕鏡法）、濁度測定法、重量測定法、パックド・ボリウム（p a c k e d v o l u m e）測定法、及びコロニー計測法（以下混積培養法という）等が知られている。しかしながら、顕鏡法、濁度測定法、重量測定法、及びパックド・ボリウム測定法等は、感度が低く、死菌体と生菌体の区別ができない問題を有し、混積培養法は生物細胞の培養を必要とするので、測定に通常1日以上の時間を要し、迅速に結果を得たい場合には適さない。ところで、上記分野における細胞数測定には、迅速且つ高感度の測定が要求され、例えば食品衛生の分野では、製品出荷のために製品の微生物汚染の検査は必要不可欠であり、従来、この検査は混積培養法により行なわれているが、検査に1日以上を要するために、結果が出るまで製品を倉庫に保管しておかなければならぬ。このため流通効率の点で問題があるだけでなく、牛乳などの製品では保管時間が長くなるにつれて微生物汚染の可能性が高くなる。また食品で汚染を問題にする微生物濃度は総じて低濃度であるため、高感度な検査が要求される。

【0003】上記の要求を満たす微生物濃度測定法として、生きた微生物には必ず存在するATPを生物発光法を用いて測定する方法が知られている。この方法は生物細胞を含む試料を、界面活性剤、トリクロロ酢酸（TCA）、トリス緩衝液、エタノール又は溶菌酵素等を含んだ抽出剤と接触させて、細胞内ATPを細胞外に抽出した後、抽出したATPを螢の発光の基質であるルシフェリンと酵素であるルシフェラーゼを含んだ発光試薬と接触させる。そして、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びATPによる酵素反応により生物発光させ、その生成した発光量を測定して細胞内ATPを測定し、生物細胞の測定を行う方法である。ところが、ATPは本来、その量の差こそあれ、すべての生物の細胞内に含まれるもので、微生物ばかりでなく、単細胞生物にも、そして動植物組織の細胞にもいわゆる死細胞として存在し、またさらに生物細胞の周辺にはフリー（遊離）のATPが存在する。従って、ある生物細胞を含有する試料から生物細胞だけに存在するATPを検出しようとしても、生物細胞中のATPと、その周辺に存在する遊離ATPが一緒にになって検出されてしまう。すなわち、生物細胞の測定にATPを指標にしようと思っても今述べた生物細胞以外の遊離ATPがバックグラウンド発光量（ノイズ）として同時に測定され、検出精度の低下を招く欠点を有していた。

50

【0004】この遊離ATPを除去する技術として本出願人は先に「ATP消去剤、ATP消去法、それを用いた生物細胞測定試薬及び生物測定法」(特開平9-182600)を出願した。この出願は、アデノシンリン酸デアミナーゼを単独で使用するか、または該アデノシンリン酸デアミナーゼと共にアピラーゼ、アルカリホスフォターゼ、酸性ホスフォターゼ、ヘキソキナーゼ及びアデノシントリホスファターゼからなる群より選ばれる少なくとも1種を併用するATP消去法、ATP消去剤、それを用いた生物細胞の測定試薬及び生物細胞の測定法である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで本願発明者はさらに研究を進め、検査用器具に遊離ATP消去剤、ATP抽出剤、さらに発光試薬を組み込めば、簡便に検体の生物細胞を高精度で測定することが可能であることを知見して本願発明を完成させた。

【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち本願発明は、遊離ATP消去剤、抽出剤、及び発光試薬を組み込んだ検体検査用器具あるいは拭取検査用器具である。

【0007】

【発明の実施の形態】本願発明においては、綿棒等で拭取により採取した検体から先ず遊離ATPを遊離ATP消去剤にて分解し、次いで生物細胞由来のATPを抽出剤で抽出する。そして、抽出された生物細胞由来のATPに発光試薬を作用させてその発光量により、ATPすなわち生物細胞を検知するのである。遊離ATP消去剤としては、アピラーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ヘキソキナーゼ、アデノシントリホスファターゼ及びアデノシンリン酸デアミナーゼを単独あるいは複数組み合わせた試薬を挙げることができる。ATP抽出試薬としては、例えば、エタノールとアンモニアの混合液、メタノール、エタノール、界面活性剤、トリクロロ酢酸、過塩素酸等が使用できる。界面活性剤はATPの抽出効率が高いので、ATP抽出試薬として好適である。界面活性剤としては、アニオン界面活性剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ラウリル硫酸カリウム、モノラウロイルリン酸ナトリウム、アルキルベンズルホン酸ナトリウム)、カチオン界面活性剤(例えば、塩化ベンザルコニウム(BAC)、塩化ベンゼトニウム(BZC)、塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ミリスチルジメチルベンジルアンモニウム)、両性(ツイッター)界面活性剤(例えばTwittergent Detergent 3-08, 3-10, 3-12, 3-14, 3-16, Tego)、非イオン性界面活性剤(例えば、Tween20, 60, 80, Span 60, 80, Triton X-45, X-100, ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル)が使用できる。発光試薬としては、蛍の発光の基質であるルシフェリンと酵素であるルシフェラ

ーゼを含んだ試薬等を挙げることができる。

【0008】まず図1において、1は本願発明にかかる拭取検査用器具を示し、主に上下が開口され管状に形成された本体2、該本体2の上部開口3より着脱自在に挿通されて成る検体拭取具4、及び本体2の下部開口5に嵌装されて成る生物細胞の検体検査用器具6より構成されている。検体拭取具4は、棒状の綿軸7とその下端部に卵状に形成されて設置されている綿部8より成る綿棒9、及び該綿棒9を保持する保持部材10より構成され、本体2より取り外されて検体の表面を綿棒9で拭き生物細胞を採取する機能を有する。

【0009】保持部材10は、下段の小径部11と上段の大径部12より成り、小径部11の径は、本体2に挿入された場合、任意の位置で停止する程度の大きさとする。そして、その段部13は、本体2の上端部14と当接し、検体拭取具4の下動時にストッパーの役目をする。なお詳細に述べると、本体2の上部開口3の内壁面には、軸方向に直線状の突起部材15が図4に示すように設けられている。そしてこの突起部材15の先端部16と保持部材10の中段部に設けられているつぼ状部材17の外周部が摺動し、摺動面を少なくしてその動きを円滑にしている。

【0010】検体検査用器具6は、図2に示すように、カップ状に形成された測定容器20、その開口部21に嵌装されていて上方に位置するATP消去剤容器22、及び下方に位置する抽出剤容器23より構成されており、本体2の下部開口5の上方に形成された段部24に当接するまで押込嵌装される。ATP消去剤容器22は、円筒状をしており、その上下の開口部にはシール材25, 26が貼着されており、これによりATP消去剤容器22には密閉室27が形成され、この室27には、綿部8に付着している遊離ATPを消去するための遊離ATP消去剤28が収納されている。

【0011】ATP消去剤容器22の下方には、図2に示すようなブレーカ29が設けられている。ブレーカ29は、その先端部に突起30を備え中心部に向けて図3のごとく例えれば6片設けられたブレーカ片31より構成されており、後述するごとく綿棒9の下動によりブレーカ片31でシール材26を破る機能を有している。なお、このとき同時に後述する抽出剤容器23の上方のシール材33も破られる。そして、本体2の段部24近辺には、ATP消去剤容器22に設けられているブレーカ29と同じ構造をしたブレーカ32が設けられており、やはり後述するごとく綿棒9の下動によりシール材25を破る機能を有している。また、ATP消去剤容器22におけるブレーカ29は、綿部8の表面を搔取り、そこに付着しているものの遊離ATP消去剤28への移行をより効果的に促進させる機能も有する。またさらに、綿棒9は、下動時にブレーカ29によって少し抵抗を受けけるが、これにより遊離ATP消去剤28と綿部8の接触

時間がより長く保持される。あるいは人為的にその時点で綿棒9の下動を停止させることが可能である。

【0012】次ぎに抽出剤容器23であるが、構造は上記したATP消去剤容器22と同じで、上下の開口部はシール材33, 34でシールされ、その密閉室35には、採取した生物細胞によるATPを抽出させるための抽出剤36が収納されている。そしてさらに、抽出容器23は、ブレーカ37を下方に備え、綿部9の下動によりシール材34を破る機能を有している。なお、抽出容器23のブレーカ37にも、前記ブレーカ29と同様に綿部8の表面を搔取る等の機能が備わっている。

【0013】そして、かく形成されたATP消去剤容器22と抽出剤容器23が測定容器20に嵌装されるため、該容器20には密閉室38が形成され、この室38には発光試薬39が収納される。ATP消去剤容器22と抽出剤容器23の測定容器20への嵌装に際しては、ATP消去剤容器22と測定容器20の上端面41, 42を同一面にすると検体検査用器具6が小型化される。さらに、シール材25で測定容器20の上端面42までシールすることにより、検体検査用器具6の開口部は完全に密封されることになり、後述するごとく該器具6を単独で流通させる場合、外部からの雑菌防止に役立ち、三種類の試薬を収納した測定容器となる。上記ブレーカ29, 32, 37は、シール材25, 26, 33, 34が容易に綿棒9により破られる場合は、必ずしも設置しなくともよく、必要に応じて設ければよい。

【0014】

【作用】①拭取検査用器具1に関し、最初は図1に示すように、検体拭取具4は途中まで挿入された状態で提供される。また、発光試薬39、遊離ATP消去剤28、及び抽出剤36は、測定容器20、ATP消去剤容器22、及び抽出剤容器23にそれぞれ封入された状態である。

②検体拭取具4を本体2より引き抜き、綿棒9により検体表面を拭き、生物細胞を採取する。

③生物細胞を採取した検体拭取具4を本体2に再度挿入する。

④検体拭取具4すなわち綿棒9を押し下げ、ブレーカ32によりシール材25を破り綿部8を遊離ATP消去剤28に浸す。そして、ブレーカ29による抵抗を検知あるいは本体2にインジケータを設けその指示等により、シール材26を破らず遊離ATPが消去されるまでこの状態を保持する。このとき、綿部8の表面をブレーカ32が花びら状に開かれる過程でブレーカ32の先端で搔取る行程があるために綿部8の表面に付着したものを効率よく遊離ATP消去剤28に移行することを可能にしている。

⑤綿棒9をさらに押し下げ、ブレーカ29によりシール材26, 33を破り、綿部8を抽出剤36に浸す。そしてこの行程において、綿棒9のさらなる押し下げについ

ては、ブレーカ37より抵抗を受けるため綿部8と抽出剤36との接触が必然的に長くなり、生物細胞からのATPの抽出及び消去反応停止が保証される。

⑥検体拭取具4を保持部材10の段部13と本体2の上端部14が当接するまで押し下げる。この操作により、ブレーカ37よりシール材34が破られ、生物細胞を含んだ抽出剤36が、測定容器20へ落下流入する。

⑦拭取検査用器具1全体を軽く振ることにより、発光試薬39と抽出剤36が接触し、発光反応によりこの部分が光り、生物細胞の検出ができる。

【0015】以上拭取検査用器具1について説明したが、検体検査用器具6単独でも検査具として利用可能である。すなわち、綿棒は市販品の物でよく、その綿棒で検体を拭取り後検体検査用器具6の上端部より突き刺し、シール材25, 26, 33, 34を順次破り上記作用の欄で説明したような手順で実施すれば、検体の生体細胞を検査することができる。その場合、図2に示す例、図5に示すようにシール材25のブレーカ32を冠着させた例等を挙げることができる。

【0016】次ぎに図6に拭取検査用器具の他の実施例を示す。本実施例における拭取検査用器具1Aは、測定容器20Aを上下動自在方式とし、ATP消去剤容器22と抽出剤容器23を本体2の段部24上に挿入設置した例である。測定容器20Aは、その開口部がシール材43で密封され、その内部に発光試薬39が収納されている。一方、本体2の段部24の下方には、その先端部が鋭角状に形成されパイプ状をしたシール破り部材44が設けられており、測定容器20Aを押し上げることにより、シール材43をシール破り部材44で破り、該容器20Aを開放する構成となっている。そして、本体2の下方部には、上方よりブレーカ32A、遊離ATP消去剤28が密封されたATP消去剤容器22、抽出剤36が密封された抽出剤容器22が順次設置され、綿棒9の下動により遊離ATPの消去、次いで生物細胞からATPの抽出と消去反応の停止が同時に行われ、最後に抽出剤容器22のシール材34が破られ生物細胞由来のATPを含んだ抽出剤36は、シール破り部材44の連通孔45より測定容器20へ落下流入し、発光試薬39と接触し発光反応により生物細胞の検出ができる。

【0017】次ぎに図7に検体検査用器具6の他の実施例を示す。本実施例は、検体検査用器具6の測定用記20の開口部21における該容器20の外径よりも大なるシール材25Aで該開口部21をシールした例である。本実施例により、測定容器20の外径よりはみ出た部分25Bを指で摘み、シール材25Aを剥がすことにより、綿棒9でシール材25Aを破る手間が省ける。さらに、シール材25Aとして丈夫なものを用いることもでき、単独製品として品質が向上する。

【0018】

【発明の効果】本願発明は以上述べたごとく構成されて

7

おり、遊離ATPを消去し目的とする生物細胞のみを測定することができるため、高精度な測定ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】拭取検査用器具の正面断面図

【図2】検体検査用器具の拡大断面図

【図3】図2の3-3視断面図

【図4】図1の4-4視断面図

【図5】検体検査用器具の他の実施例図

【図6】拭取検査用器具の他の実施例図

【図7】検体検査用器具の他の実施例図

【符号の説明】

1 拭取檢查用器具

2 本体

4 檢體拭取具

6 検体検査用器具

9 綿棒

10 保持部材

17 つば状部材

20 測定容器

22 ATP消去

2.3 抽出剤容器

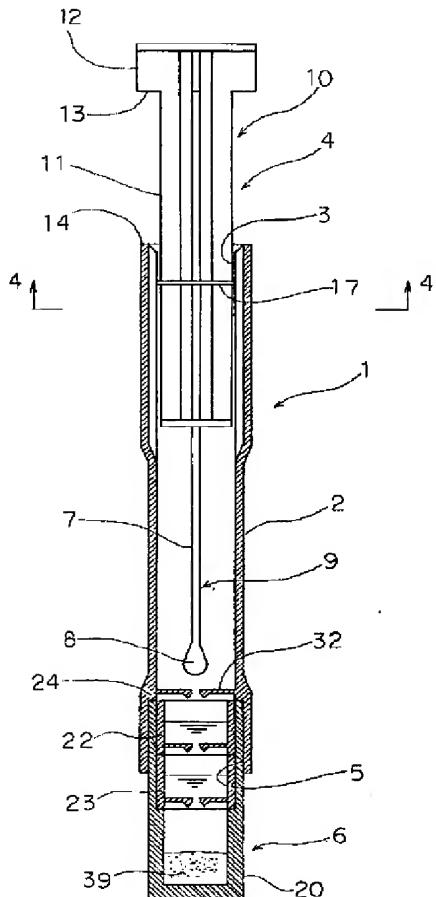
28 遊離ATP消去剤

36 抽出剤

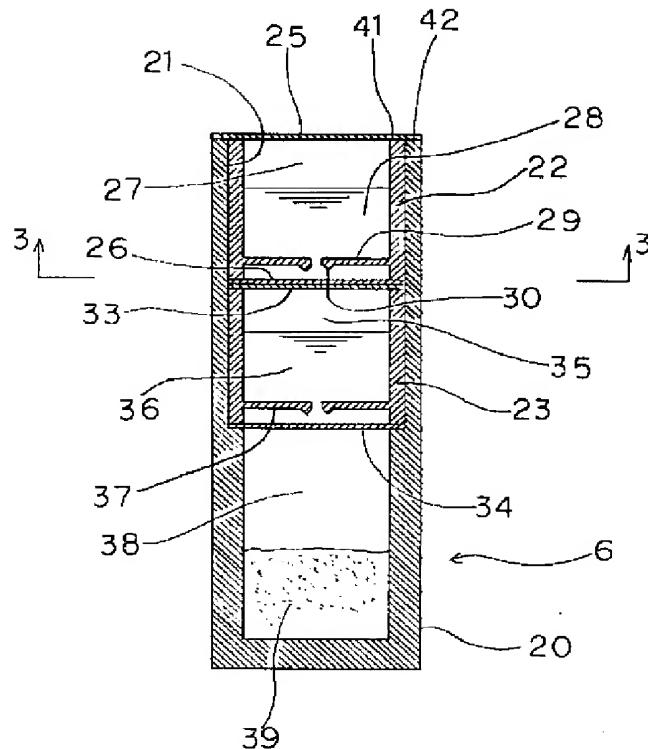
39 発光試薬

8

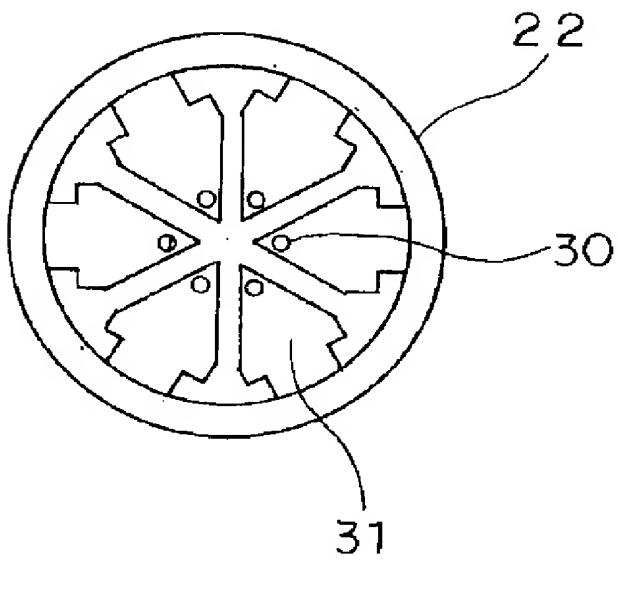
【図1】



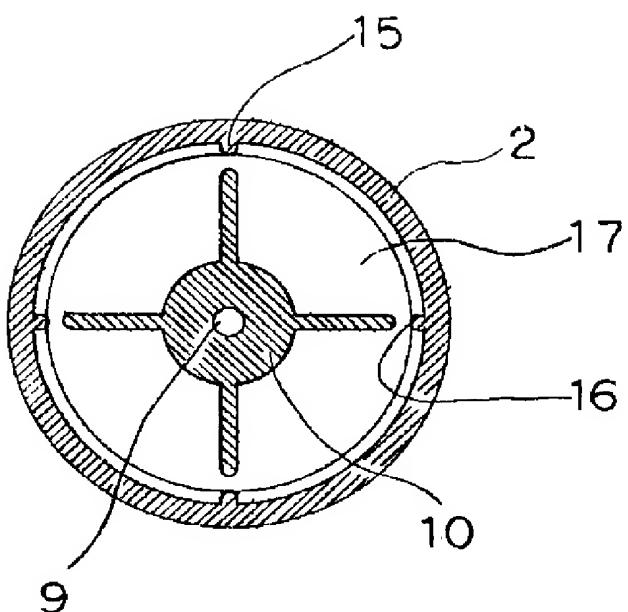
【図2】



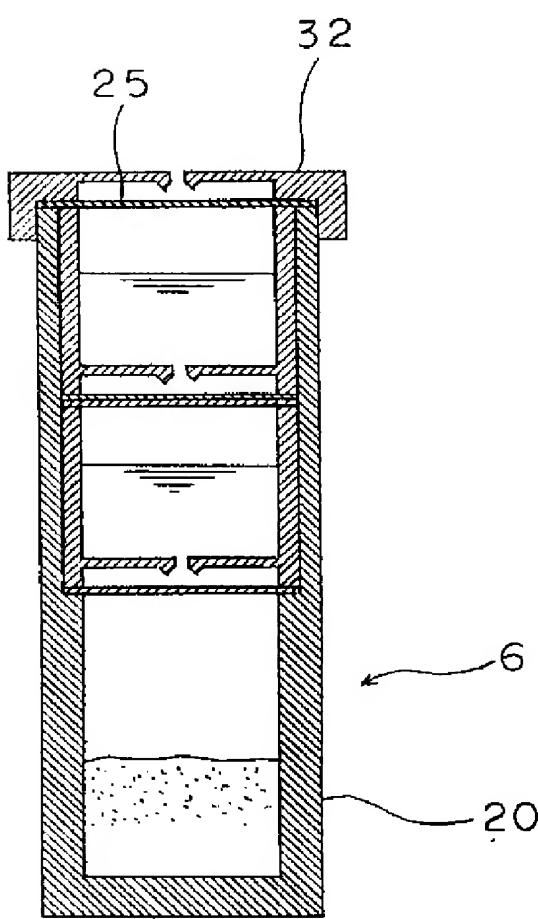
【図3】



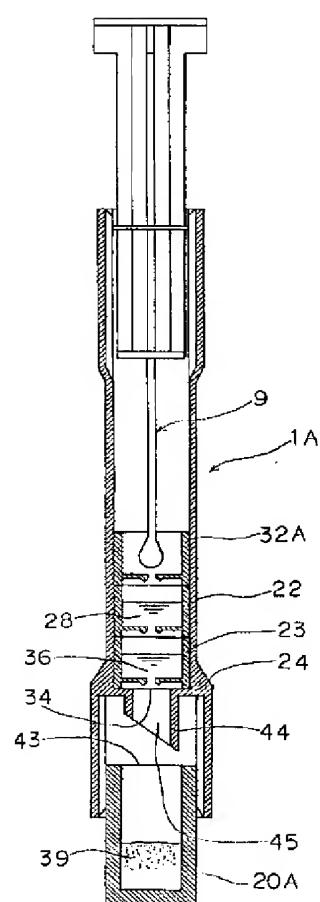
【図4】



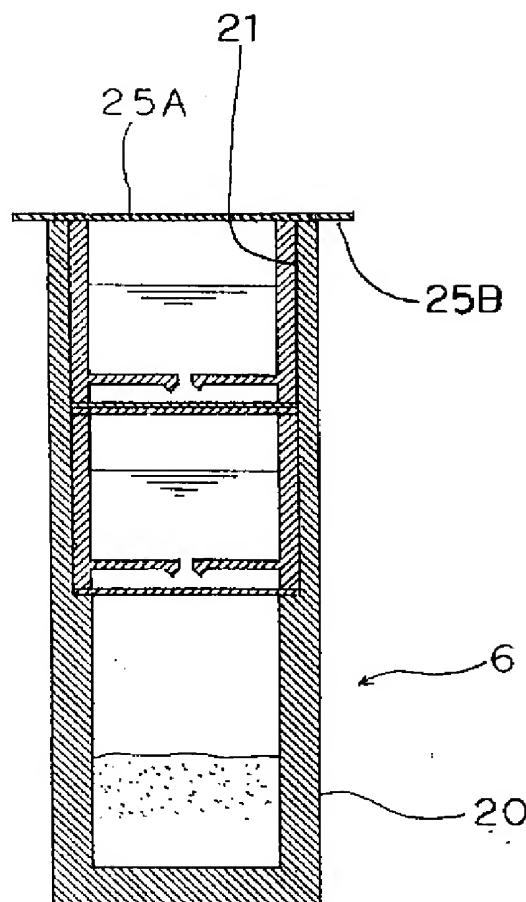
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int.C1.7

G O 1 N 33/483

識別記号

F I

G O 1 N 33/483

テマコト(参考)

C

PAT-NO: JP02001000170A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2001000170 A
TITLE: SPECIMEN INSPECTION TOOL AND
TOOL FOR WIPE TEST
PUBN-DATE: January 9, 2001

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
HARADA, YASUHIRO	N/A
MURAKAMI, SEIJI	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KIKKOMAN CORP	N/A

APPL-NO: JP2000117611

APPL-DATE: April 19, 2000

PRIORITY-DATA: 11115077 (April 22, 1999)

INT-CL (IPC): C12M001/34 , C12M001/30 , G01N001/04 ,
G01N001/10 , G01N021/78 , G01N033/483

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a tool for measuring ATP in high accuracy.

SOLUTION: The wipe test tool 1 comprises a specimen wipe tool

equipped with a tubular top and bottom-opened body 2, a holder 10 that is detachably attached to the top opening 3 of the body 2 and a cotton swab 9 held by the holder 10, a measuring vessel 20 that has the shape of a test tube and includes a light-emitting reagent 39, an ATP-erasing vessel 22 which has a tubular shape and whose upper and lower opening parts are sealed with a sealing material and in which a free-form ATP eraser is sealed and an extracting reagent vessel 23 which has also a tubular shape whose upper and lower parts are sealed with a sealing material and in which an extracting reagent is sealed, where the vessel 22 is arranged to the upper opening of the measuring vessel 20, while the vessel 23 is arranged to its lower side, and the specimen inspection tool 6 is fitted to the lowermost opening of the body 2.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO